



Darüber hinaus stellt die Verwendung von RNase und auch von alkoholhaltigen Puffern einen großen Kostenfaktor dar. Gerade in der Produktion von Plasmid-DNA im großen Maßstab (large scale), also in Bereichen von etwa >2 g, ist dies ein nicht zu unterschätzender Kostenfaktor. Bei Verwendung von Alkoholen kommt zusätzlich  
5 eine Belastung der involvierten Mitarbeiter und der Umwelt als bedeutender Faktor hinzu.

Ein generelles Problem bei der Aufreinigung von Nukleinsäuren aus prokaryontischen, aber auch aus eukaryontischen Zellen besteht in der zunächst  
10 durchzuführenden Lyse der Zellen, um eine Freisetzung der Nukleinsäuren zu bewirken. In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die von Birnborn und Dohly (Nucl. Acids Res. 7, pp. 1513 – 1522; 1979) grundsätzlich beschriebene alkalische Lyse bevorzugt, jedoch nicht darauf beschränkt. Weitere Möglichkeiten sind die Lyse durch Hitze oder Lyse in Anwesenheit von Detergenzien. Als ungeeignet hat sich die  
15 Lyse durch hohen Druck (French Press) erwiesen, da die entstehenden hohen Scheerkräfte sehr kleine Fragmente genomischer DNA entstehen, die praktisch nicht mehr von der Plasmid-DNA zu trennen sind.

Zur Aufreinigung der Nukleinsäuren aus einem solchen Lysat sind  
20 chromatographische Verfahren aus dem Stand der Technik bekannt. Hierbei sind generell zwei Verfahren zu unterscheiden. Zum einen ist die Methode nach Gillespie und Vogelstein (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 76 pp. 615 – 619; 1979) aus dem Stand der Technik bekannt. Bei dieser Methode erfolgt eine Aufreinigung der Nukleinsäure durch Bindung an Silicagel oder Diatomeenerde in Anwesenheit von chaotropen  
25 Salzen, wie z.B. GuHCl, NaI, etc. Im Gegensatz zum Anionenaustauscher erfolgt die Bindung der DNA in Anwesenheit von hohen Salzkonzentrationen, wogegen die Elution bei niedrigen Salzkonzentrationen erfolgt. Da bei dieser Methode die Bindung der Nukleinsäuren nach dem 'alles oder nichts'-Prinzip abläuft, ist keine quantitative Separation von RNA, ssDNA und Proteinen möglich. Daher sind die mittels dieser  
30 Methode gewonnenen DNA-Proben aufgrund ihrer Kontaminationen mit RNA und Proteinen nicht für einen Einsatz in der Gentherapie geeignet.

Zum zweiten ist die Reinigung mittels eines Anionenaustauschers zu nennen, wie sie in EP 0268 946 beschrieben ist. Hierbei werden Zellen, wie z.B. Bakterien,

vorzugsweise mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen. Die zellulären Proteine und genomische DNA werden mit Hilfe von Detergenzien und anschließender Zentrifugation abgetrennt. So gewonnene, Plasmid-DNA enthaltende Überstände werden als geklärtes Lysat (cleared lysate) bezeichnet. Das geklärte Lysat wird über  
5 eine Anionen-Austauscher-Säule (z.B. QIAGEN®, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt, wobei eine quantitative Abtrennung von RNA und ssDNA erfolgt.

Das dem erfindungsgemäßen Verfahren zu Grunde liegende technische Problem ist  
10 die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus einem Nukleinsäuregemisch und die Verbesserung der Trennung von Kontaminanten wie RNA, ssDNA und genomischer DNA ohne Verwendung einer RNase. Eine weitere der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe ist es, ein Verfahren bereitzustellen, dass eine Aufreinigung von Plasmiden auch im 'large scale' kostengünstig und umweltschonend erlaubt.

15 Überraschenderweise wird das der Erfindung zu Grunde liegende technische Problem durch ein Verfahren gemäß der Ansprüche gelöst. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird zur Trennung der Plasmid-DNA von den übrigen Bestandteilen des Nukleinsäuregemisches, insbesondere anderen  
20 Nukleinsäurespezies,

- a) gegebenenfalls das Nukleinsäuregemisch mit einem oder mehreren Alkalisalzen und/oder Erdalkalisalzen in einer wässrigen Lösung auf eine Leitfähigkeit eingestellt wird, die einer Leitfähigkeit von 70 mS bis 95 mS bei  
25 einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht, und
- b) das Nukleinsäuregemisch mit einem chromatographischen Trägermaterial in Kontakt gebracht wird, und
- a) das Trägermaterial anschließend mindestens einmal mit einer Lösung enthaltend ein Alkalisalz in einem Konzentrationsbereich von 900 mM bis  
30 1800 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 und/oder ein Erdalkalisalz in einem Konzentrationsbereich von 100 mM bis 240 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 gewaschen wird, und
- c) die an das chromatographischen Trägermaterial gebundene Plasmid DNA anschließend mit einer Lösung enthaltend ein Alkalisalz in einer Konzentration

von 1300 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 und/oder ein Erdalkalisalz in einer Konzentration von 270 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 eluiert wird.

5 Zur Gewinnung eines Nukleinsäuregemisches müssen die Zellen, wobei es prokaryontische oder eukaryontische Zellen sein können, zunächst lysiert werden. Dies kann in der oben beschriebenen Weise geschehen. In dem erfindungsgemäßen Verfahren wird die von Birnborn und Dohly (Nucl. Acids Res. 7, pp. 1513 – 1522; 1979) grundsätzlich beschriebene alkalische Lyse bevorzugt, jedoch nicht darauf  
10 beschränkt. Weitere Möglichkeiten sind die Lyse durch Hitze oder Lyse in Anwesenheit von Detergenzien. Als ungeeignet hat sich die Lyse durch hohen Druck (French Press) erwiesen, da durch die entstehenden hohen Scheerkräfte sehr kleine Fragmente genomischer DNA entstehen, die praktisch nicht mehr von der Plasmid-DNA zu trennen sind.

15

Ein Nukleinsäuregemisch im Sinne der Erfindung kann dabei ein Zelllysat ebenso wie ein vorgereinigtes oder geklärtes Lysat sein, kann aber auch ein artifizielles Gemisch darstellen, bei dem Plasmid-DNA mit mindestens einer weiteren Nukleinsäurespezies und gegebenenfalls anderen Kontaminanten verunreinigt ist. In  
20 einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei dem Nukleinsäuregemisch um ein prokaryontisches geklärtes Lysat.

Das erfindungsgemäße Verfahren gewährleistet die chromatographische Abtrennung der erwähnten Kontaminanten und liefert eine Plasmid-DNA, die die Anforderungen  
25 an die Reinheit zum Einsatz in der Gentherapie oder genetischen Vakzinierung erfüllt. Chromatographie versteht der Fachmann dabei als Sammelbegriff für die physikalisch-chemische Trennung von Substanzgemischen aufgrund ihrer unterschiedlichen Verteilung zwischen einer stationären Phase und einer mobilen Phase. In dem hier gegenständliche Verfahren wird zur Trennung der Plasmid-DNA  
30 von den Kontaminanten ein Anionenaustauscher-Material verwendet. Überraschenderweise zeigt insbesondere das im Handel erhältliche Material QIAGEN® (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) seine Eignung im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt zu werden. Dieses Material ermöglicht mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens eine sehr effiziente Abtrennung der RNA,

aber auch von z.B. ssDNA, von Plasmid-DNA. RNA und ssDNA eluieren bei hier näher definierten Bedingungen in einem distinkten Peak, der in dem erfindungsgemäßen Verfahren sehr weit von dem ebenfalls sehr distinkten Peak der Plasmid-DNA entfernt liegt. Die Gefahr einer Coelution von Plasmid-DNA und RNA  
 5 bzw. ssDNA ist somit im Vergleich zu den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren deutlich verringert.

Das unter der Bezeichnung QIAGEN® (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) erhältliche chromatographische Trägermaterial ist ein modifiziertes poröses  
 10 anorganisches Material. Für ein chromatographische Trägermaterial im erfindungsgemäßen Verfahren kommen als anorganische Trägermaterialien Silicagel, Diatomeenerde, Glas, Aluminiumoxide, Titanoxide, Zirkonoxide, Hydroxylapatit und als organische Trägermaterialien solche wie Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrolharze oder Copolymere aus den monomeren Bestandteilen der  
 15 genannten Materialien in Frage.

Der Anionenaustauscher, der in dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise eingesetzt wird, ist beispielsweise durch die Umsetzung eines der oben genannten Trägermaterialien in einem ersten Schritt mit einem Silanisierungsreagenz der  
 20 allgemeinen Formel I



wobei

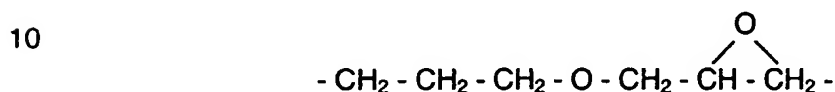
25

$R^1$  ein Alkoxyrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere  $-OCH_3$ ,  $-OC_2H_5$  oder  $-OC_3H_7$ , oder ein Halogenatom, insbesondere  $-Cl$ , oder eine Dialkylaminogruppe mit identischen oder unterschiedlichen Alkylresten mit 1 bis 6 C-Atomen;

$R^2$  und  $R^3$  unabhängig voneinander ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 10 C-  
 30 Atomen, insbesondere  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$  oder  $-C_3H_7$ , oder ein Alkoxyrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere  $-OCH_3$ ,  $-OC_2H_5$  oder  $-OC_3H_7$ , oder ein Halogenatom oder ein durch mindestens ein Sauerstoffatom oder eine Aminogruppe unterbrochener Alkylrest mit 4 bis 20 C-Atomen, wobei dieser Rest auch ein ein-

oder mehrfach durch Halogen, Cyano, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Hydroxy oder Aryl substituiert sein kann;

5  $R^4$  eine Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 20 C-Atomen oder ein durch mindestens ein Sauerstoffatom oder eine Aminogruppe unterbrochener Alkylrest, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyano, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert sein kann, insbesondere



ist,

gefolgt von einem zweiten Schritt, wobei der im ersten Schritt modifizierte Träger  
15 umgesetzt wird mit einem Reagenz der allgemeinen Formel II



wobei

20

X eine Amino-, Hydroxy-, Epoxy-Gruppe oder ein Halogenatom,

R eine Kohlenwasserstoffkette mit 2 bis 20 C-Atomen oder ein durch mindestens ein Sauerstoffatom oder eine Aminogruppe unterbrochener Alkylrest, wobei  
25 dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyano, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert sein kann,

Y ein Kohlenwasserstoffrest mit Anionenaustauscher bildenden funktionellen Gruppen mit 1 bis 10 C-Atomen, der ein- oder mehrfach mit Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium substituiert sein kann, ist, wie  
30 auch in EP 0 743 949, Seite 4 bis 5, auf die hier inhaltlich Bezug genommen wird, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführung wird das Nukleinsäuregemisch gemäß des fakultativen Schritts a) des oben beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens mit

5 einem oder mehreren Alkalisalzen und/oder Erdalkalisalzen in einer wässrigen Lösung auf eine Leitfähigkeit eingestellt, die einer Leitfähigkeit von 70 mS bis 95 mS bei einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Leitfähigkeit einer salzhaltigen Lösung in  
10 Abhängigkeit von der jeweiligen Temperatur und dem pH-Wert deutlich variieren kann und er kann aufgrund der ihm geläufigen Gesetzmäßigkeiten eine entsprechende Anpassung der Leitfähigkeiten bei Veränderungen der Temperatur und/oder des pH-Wertes vornehmen, sodass eine Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens auch bei Veränderung dieser Parameter problemlos möglich ist.

Die in dem erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise eingesetzten Salze sind Alkalisalze, also Salze, bei denen die kationische Komponente bzw. ein Teil der kationischen Komponente aus einem Element der ersten Hauptgruppe des  
15 Periodensystems der Elemente stammt, und/oder sind Erdalkalisalze, also Salze, bei denen die kationische Komponente bzw. ein Teil der kationischen Komponente aus einem Element der zweiten Hauptgruppe des Periodensystems der Elemente stammt. Besonders bevorzugt handelt es sich bei den Alkalisalzen um Alkalihalogenide und bei den Erdalkalisalzen um Erdalkalihalogene. Besonders  
20 bevorzugt ist die Verwendung der Alkalihalogenide KCl, NaCl, CsCl und/oder LiCl sowie des Erdalkalihalogens  $\text{CaCl}_2$ . Alternativ zu den Alkali- bzw. Erdalkalisalzen kann auch ein Ammoniumsalz (Pseudoalkalisalz), bevorzugt ein Ammoniumsalz einer Carbonsäure, besonders bevorzugt Ammoniumacetat in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden. Ganz besonders bevorzugt  
25 handelt es sich bei den verwendeten Salzen um KCl und/oder NaCl. Neben den einzelnen Salzen können in dem erfindungsgemäßen Verfahren auch Gemische aus verschiedenen Alkalisalzen und/oder Erdalkalisalzen verwendet werden.

In dem oben beschriebenen Waschschrift c) zur Elution der Kontaminanten werden  
30 Alkalisalze in einem Konzentrationsbereich von 900 mM bis 1800 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 und/oder Erdalkalisalze in einem Konzentrationsbereich von 100 mM bis 240 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 eingesetzt. Für den Waschschrift können grundsätzlich alle für den Fachmann sinnvoll erscheinenden wässrigen Lösungen eingesetzt werden, z.B. gepufferte Systeme wie beispielsweise,

aber nicht beschränkt auf, Tris-, Kaliumacetat-, Borat- oder MOPS-gepufferte Systeme, oder alternativ ungepufferte Systeme, d.h. die Salze werden ausschließlich in Wasser gelöst. Aus unterschiedlichen Puffersystemen können potentiell auch unterschiedliche pH-Werte resultieren bzw. diese können eingestellt werden. Die hier  
5 gewählten Konzentrationsbereiche beziehen sich auf einen pH-Wert von 7 bis 7,4, grundsätzlich kann der pH-Wert der Waschlösung in dem oben erwähnten pH-Bereich aber variiert werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass bei Veränderung des pH-Wertes einer solchen Waschlösung auch die Konzentration der darin enthaltenen Salze geändert werden muss, um den gleichen Effekt, in diesem Fall also die Elution  
10 der Kontaminanten, zu erzielen, d.h. es kommt bei Durchführung des Verfahrens zu einer Verschiebung der Elutionspunkte von Kontaminanten (z.B. RNA) und Plasmid-DNA, bei gleichem pH-Wert von Wasch- und Elutionslösung nicht aber zu einer Verschiebung des Verhältnisses der Elutionspunkte, was bedeutet, dass der Abstand der Elutionspeaks der unterschiedlichen Nukleinsäurespezies vorteilhafterweise  
15 immer gleich bleibt. Die hierzu erforderlichen Parameter kann der Fachmann anhand seines Fachwissens ohne erfinderisches Zutun vornehmen. Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst mindestens einen Waschschrift, es können aber auch mehrere, in der Anzahl dem Fachmann sinnvoll erscheinend, Waschschriffe, auch mit untereinander verschiedenen erfindungsgemäßen Waschpuffern, durchgeführt  
20 werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird mindestens ein Waschschrift durchgeführt mit einer Lösung enthaltend KCl in einem Konzentrationsbereich von 1100 mM bis 1800 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4, besonders bevorzugt  
25 wird mindestens ein Waschschrift durchgeführt mit einer Lösung enthaltend KCl in einem Konzentrationsbereich von 1300 mM bis 1700 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird mindestens ein Waschschrift  
30 durchgeführt mit einer Lösung enthaltend NaCl in einem Konzentrationsbereich von 950 mM bis 1200 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4, besonders bevorzugt wird mindestens ein Waschschrift durchgeführt mit einer Lösung enthaltend NaCl in einem Konzentrationsbereich von 1100 mM bis 1150 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4.



In dem oben beschriebenen Elutionsschritt d) zur Elution der Plasmid-DNA werden Alkalisalze in einer Konzentration von 1300 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 und/oder Erdalkalisalze in einer Konzentration von 270 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 eingesetzt. Für den Elutionsschritt können analog zum Waschschrift grundsätzlich alle für den Fachmann sinnvoll erscheinenden wässrigen Lösungen eingesetzt werden, z.B. gepufferte Systeme wie beispielsweise, aber nicht beschränkt auf, Tris-, Kaliumacetat-, Borat- oder MOPS-gepufferte Systeme, oder alternativ ungepufferte Systeme, d.h. die Salze werden ausschließlich in Wasser gelöst. Aus unterschiedlichen Puffersystemen können potentiell auch unterschiedliche pH-Werte resultieren bzw. diese können eingestellt werden. Die hier gewählten Konzentrationsbereiche beziehen sich auf einen pH-Wert von 7 bis 7,4, grundsätzlich kann der pH-Wert der Elutionslösung in dem oben erwähnten pH-Bereich aber variiert werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass bei Veränderung des pH-Wertes einer solchen Elutionslösung auch die Konzentration der darin enthaltenen Salze geändert werden muss, um den gleichen Effekt, in diesem Fall also die Elution der Plasmid-DNA, zu erzielen, d.h. es kommt bei Durchführung des Verfahrens zu einer Verschiebung der Elutionspunkte von Kontaminanten (z.B. RNA) und Plasmid-DNA, bei gleichem pH-Wert von Wasch- und Elutionslösung nicht aber zu einer Verschiebung des Verhältnisses der Elutionspunkte, was bedeutet, dass der Abstand der Elutionspeaks der unterschiedlichen Nukleinsäurespezies vorteilhafterweise immer gleich bleibt. Die hierzu erforderlichen Parameter kann der Fachmann anhand seines Fachwissens ohne erfinderisches Zutun vornehmen.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Elutionsschritt durchgeführt mit einer Lösung enthaltend KCl in einer Konzentration von 1900 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4. Dabei ist die Konzentration von KCl nach oben nur durch seine Löslichkeit in der verwendeten Lösung begrenzt.

30

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Elutionsschritt durchgeführt mit einer Lösung enthaltend NaCl in einer Konzentration 1300 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4. Dabei ist die Konzentration von NaCl nach oben nur durch seine Löslichkeit in der verwendeten Lösung begrenzt.

- Die Einstellung der Leitfähigkeit des Nukleinsäuregemisches vor in Kontakt bringen des Nukleinsäuregemisches mit dem chromatographischen Trägermaterial erfolgt, wie oben bereits erwähnt, ebenfalls mit Alkalisalzen und/oder Erdalkalisalzen. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das Nukleinsäuregemisch mit
- 5 KCl auf eine Leitfähigkeit eingestellt, die einer Leitfähigkeit von 70 mS bis 85 mS bei einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht, ganz besonders bevorzugt auf eine Leitfähigkeit, die einer Leitfähigkeit von 70 mS bis 80 mS bei einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht. In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform wird das
- 10 Nukleinsäuregemisch mit NaCl auf eine Leitfähigkeit eingestellt, die einer Leitfähigkeit von 70 mS bis 95 mS bei einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht, ganz besonders bevorzugt auf eine Leitfähigkeit, die einer Leitfähigkeit von 85 mS bis 95 mS bei einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht.
- 15
- In einer bevorzugten Ausführungsform wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren mindestens in dem oben mit c) gekennzeichneten Waschschriff des chromatographischen Trägermaterials das Alkalihalogenid KCl eingesetzt.
- 20 Das erfindungsgemäße Verfahren wird bevorzugt bei Raumtemperatur durchgeführt. Raumtemperatur bedeutet im vorliegenden Falle, dass das Verfahren bei normalen Prozessbedingungen durchgeführt wird, entsprechend etwa einem Rahmen von 18°C bis 25°C. Grundsätzlich kann das Verfahren bei allen dem Fachmann sinnvoll erscheinenden Temperaturen durchgeführt werden.
- 25
- Vorzugsweise eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Aufreinigung von Plasmid-DNA. Überraschender- und vorteilhafterweise hat sich gezeigt, dass Plasmide unterschiedlichster Größe keine signifikanten Unterschiede in den Elutionspunkten, d.h. in den Salzkonzentrationen, bei welchen eine Elution der
- 30 Plasmid-DNA vom chromatographischen Trägermaterial erfolgt, zeigen. Eine Adaption der Parameter des Verfahrens, wie beispielsweise Salzkonzentrationen oder pH-Werte, an unterschiedliche Plasmidgrößen ist somit nicht erforderlich.

Da mit dem Erfindungsgegenstand ein Verfahren zur Verfügung steht, in dem auch im 'large scale' Plasmid zur Herstellung eines Plasmid-DNA-haltigen Mittels zum Einsatz in der Gentherapie oder genetischen Vakzinierung gewonnen werden können, kann vorteilhafterweise eine Endotoxinentfernung völlig problemlos in das  
5 Verfahren eingebaut werden. Hierzu können nahezu alle aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren benutzt werden. Beispielsweise kann das geklärte Lysat mit einem aus dem Stand der Technik bekannten Endotoxin-Entfernungspuffer (z.B. enthaltend Triton X 100, Triton X 114, Polymyxin, etc.) versetzt werden und ohne Änderung im vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahrens weiter verwendet werden.

10

## Abbildungen

### Abbildung 1:

15

Aufgetragen ist die Extinktion bei 254 nm des Durchflusses einer mit QIAGEN®-Chromatographiematerial gefüllten HPLC-Säule gegen die KCl-Konzentration. Dargestellt ist die Elution unterschiedlicher Nukleinsäurespezies mit steigender KCl-Konzentration. Die Versuchsbedingungen sind in Beispiel 2 näher erläutert.

20

## Beispiele

### Beispiel 1: Aufreinigung von pCMV $\beta$ aus E.coli DH5 $\alpha$

25

Aus 30 L einer Übernacht-Fermentationskultur von E.coli DH5 $\alpha$ , enthaltend pCMV $\beta$ -Plasmid, wurde durch Zentrifugation 1 kg Biomasse gewonnen. Die Biomasse wurde in 15 L eines Resuspendierungspuffers (10 mM EDTA; 50 mM Tris/HCl pH 8) resuspendiert und anschließend mit 15 L eines Lysepuffers (200 mM NaOH; 1 %  
30 (w/v) SDS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 15 L eines Neutralisationspuffers (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) zugegeben. Das in diesem Schritt entstandene Präzipitat (Proteine, Membranbestandteile, genomische DNA, etc.) wurde anschließend entfernt. Das so vorgeklärte Lysat wurde anschließend noch filtriert, wodurch ein geklärtes Lysat erzeugt wurde. Das geklärte Lysat wies in

der Folge einen pH von 5,2 auf und wurde bei einer Temperatur von 20°C mit 3 M KCl auf eine Leitfähigkeit von 80 mS eingestellt.

5 Eine Chromatographiesäule wurde mit QIAGEN®-Chromatographiematerial gefüllt (Säulenvolumen ca. 7 L) und mit 10 Säulenvolumina eines Äquilibrationpuffers (20 mM Kaliumacetat) bei einer Flussrate von 3,3 cm/min äquilibriert. Das geklärte Lysat wurde nach der Äquilibration des Chromatographiematerials auf die Säule geladen, der Lauf erfolgte mit einer Flussrate von 1,1 cm/min. Anschließend wurden noch einmal 5 Säulenvolumina Äquilibrationpuffer (20 mM Kaliumacetat) mit einer  
10 Flussrate von 3,3 cm/min über die Säule gegeben.

Die Säule wurde direkt im Anschluss mit 10 Säulenvolumina einer KCl-Lösung (1350mM KCl; 50 mM Tris/HCl, pH 7,2) bei einer Flussrate von 3,3 cm/min gewaschen. Darauf folgend wurden die Plasmide mit einem Säulenvolumen eines  
15 Elutionspuffers (1600 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH 7,2) eluiert. Nach anschließender Ultra-/Diafiltration und finaler Sterilfiltration ergab sich eine Ausbeute von ca. 400 mg pCMVβ.

## 20 Beispiel 2:

In 4 unterschiedlichen Ansätzen wurden je 600 µg eines aufgereinigten Plasmids (1: Plasmid A [3266 bp]; 2: Plasmid B [7200 bp]; 3: Plasmid C [7687 bp]; 4: Plasmid D [19535 bp]) zusammen mit jeweils 600 µg aufgereinigter RNA (E.coli HB101) in 5 ml  
25 60 mM Kaliumacetat gelöst.

Eine HPLC-Säule (Säulenvolumen 4,4 ml) wurde mit QIAGEN®-Chromatographiematerial gefüllt und mit 2 Säulenvolumina (Flussrate 1 ml/min) Äquilibrationpuffer (60 mM Kaliumacetat) äquilibriert. Anschließend wurden in 4  
30 einzelnen Säulen mit jeweils frisch gepackten HPLC-Säulen die 5 ml des Plasmid-RNA-Gemisches mit 1 ml/min durch die Säule gegeben, die Säule anschließend mit 3 Säulenvolumina 60 mM Kaliumacetat gespült.

In einem kontinuierlichen Gradienten wurde ein Tris-Puffer über die Säule gegeben (50 mM Tris/HCl; pH 7,2; Gradient 0 bis 3 M KCl) und die Elution von DNA und RNA mittels eines Photometers (Extinktionsmessung bei 254 nm) bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bereits teilweise degradierte und kurzkettige RNA in einem

5 distinkten Peak (Maximum bei 780 mM KCl) eluiert wird, gefolgt von einem nur leicht diffusen Peak längerkettiger RNA (Maximum bei 1120 mM KCl, Ende der Elution bei 1310 mM KCl). Die Elution der Plasmid-DNA erreicht ein Maximum bei 1900 mM KCl und endet bei 2150 mM KCl. Die Ergebnisse sind als übereinandergelegte Spuren in

10 Abbildung 1 dargestellt. Es wird deutlich, dass die Plasmide vorteilhafterweise unabhängig von ihrer Größe eluieren.

**Ansprüche**

1. Verfahren zur chromatographischen Trennung eines Nukleinsäuregemisches, wobei Plasmid-DNA von anderen Bestandteilen des Gemisches, insbesondere  
5 anderen Nukleinsäuren, getrennt wird, dadurch gekennzeichnet, dass
  - b) gegebenenfalls das Nukleinsäuregemisch mit einem oder mehreren Alkalisalzen und/oder Erdalkalisalzen in einer wässrigen Lösung auf eine Leitfähigkeit eingestellt wird, die einer Leitfähigkeit von 70 mS bis 95 mS bei  
10 einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht, und
  - c) das Nukleinsäuregemisch mit einem chromatographischen Trägermaterial in Kontakt gebracht wird, und
  - d) das Trägermaterial anschließend mindestens einmal mit einer Lösung enthaltend ein Alkalisalz in einem Konzentrationsbereich von 900 mM bis  
15 1800 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 und/oder ein Erdalkalisalz in einem Konzentrationsbereich von 100 mM bis 240 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 gewaschen wird, und
  - e) die an das chromatographischen Trägermaterial gebundene Plasmid DNA anschließend mit einer Lösung enthaltend ein Alkalisalz in einer Konzentration  
20 von 1300 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 und/oder ein Erdalkalisalz in einer Konzentration von 270 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 eluiert wird.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Alkalisalz ein  
25 Alkalihalogenid ist und das Erdalkalisalz ein Erdalkalihalogenid ist.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Alkalihalogenid NaCl, KCl, CsCl und/oder LiCl ist und das Erdalkalihalogenid  $\text{CaCl}_2$  ist.
- 30 4. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäuregemisch mit KCl auf eine Leitfähigkeit eingestellt wird, die einer Leitfähigkeit von 70 mS bis 85 mS bei einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäuregemisch mit KCl auf eine Leitfähigkeit eingestellt wird, die einer Leitfähigkeit von 70 mS bis 80 mS bei einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht.

5

6. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäuregemisch mit NaCl auf eine Leitfähigkeit eingestellt wird, die einer Leitfähigkeit von 70 mS bis 95 mS bei einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht.

10

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäuregemisch mit NaCl auf eine Leitfähigkeit eingestellt wird, die einer Leitfähigkeit von 85 mS bis 95 mS bei einem pH von 4,8 bis 5,4 und bei einer Temperatur von 20°C entspricht.

15

8. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der/die Waschschrift/e aus Schritt b) von Anspruch 1 mit einer Lösung enthaltend KCl in einem Konzentrationsbereich von 1100 mM bis 1800 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 durchgeführt wird/werden.

20

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der/die Waschschrift/e aus Schritt b) von Anspruch 1 mit einer Lösung enthaltend KCl in einem Konzentrationsbereich von 1300 mM bis 1700 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 durchgeführt wird/werden.

25

10. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der/die Waschschrift/e aus Schritt b) von Anspruch 1 mit einer Lösung enthaltend NaCl in einem Konzentrationsbereich von 950 mM bis 1200 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 durchgeführt wird/werden.

30

11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der/die Waschschrift/e aus Schritt b) von Anspruch 1 mit einer Lösung enthaltend NaCl in einem Konzentrationsbereich von 1100 mM bis 1150 mM bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 durchgeführt wird/werden.

12. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Elutionsschritt aus Schritt c) von Anspruch 1 mit einer Lösung enthaltend KCl in einer Konzentration von 1900 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 durchgeführt wird.

5

13. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Elutionsschritt aus Schritt c) von Anspruch 1 mit einer Lösung enthaltend NaCl in einer Konzentration von 1300 mM oder höher bezogen auf einen pH von 7 bis 7,4 durchgeführt wird.

10

14. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass das chromatographische Trägermaterial ein Anionenaustauscher ist.

15. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass als chromatographische Trägermaterial Silicagel, Diatomeenerde, Glas, Aluminiumoxide, Titanoxide, Zirkonoxide, Hydroxylapatit, Dextran, Agarose, Acrylamid, Polystyrolharze oder Copolymere der genannten Materialien verwendet werden.

16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das chromatographische Trägermaterial erhältlich ist durch Umsetzung eines der in Anspruch 15 genannten Trägermaterialien in einem ersten Schritt mit einem Silanisierungsreagenz der allgemeinen Formel I



25

wobei

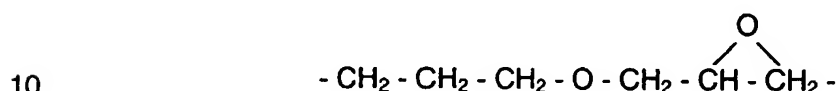
$R^1$  ein Alkoxyrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere  $-OCH_3$ ,  $-OC_2H_5$  oder  $-OC_3H_7$ , oder ein Halogenatom, insbesondere  $-Cl$ , oder eine Dialkylaminogruppe mit identischen oder unterschiedlichen Alkylresten mit 1 bis 6 C-Atomen;

30  $R^2$  und  $R^3$  unabhängig voneinander ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere  $-CH_3$ ,  $-C_2H_5$  oder  $-C_3H_7$ , oder ein Alkoxyrest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere  $-OCH_3$ ,  $-OC_2H_5$  oder  $-OC_3H_7$ , oder ein Halogenatom oder ein durch mindestens ein Sauerstoffatom oder eine Aminogruppe unterbrochener Alkylrest mit 4 bis 20 C-Atomen, wobei dieser Rest auch ein ein-



oder mehrfach durch Halogen, Cyano, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Hydroxy oder Aryl substituiert sein kann;

R<sup>4</sup> eine Kohlenwasserstoffkette mit 1 bis 20 C-Atomen oder ein durch mindestens ein Sauerstoffatom oder eine Aminogruppe unterbrochener Alkylrest, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyano, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert sein kann, insbesondere



ist,

gefolgt von einem zweiten Schritt, wobei der im ersten Schritt modifizierte Träger umgesetzt wird mit einem Reagenz der allgemeinen Formel II



wobei

20 X eine Amino-, Hydroxy-, Epoxy-Gruppe oder ein Halogenatom,  
R eine Kohlenwasserstoffkette mit 2 bis 20 C-Atomen oder ein durch mindestens  
ein Sauerstoffatom oder eine Aminogruppe unterbrochener Alkylrest, wobei  
dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyano, Nitro, Amino,  
Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert  
25 sein kann,

Y ein Kohlenwasserstoffrest mit Anionenaustauscher bildenden funktionellen Gruppen mit 1 bis 10 C-Atomen, der ein- oder mehrfach mit Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylammonium substituiert sein kann, ist.

30 17. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren bei Raumtemperatur durchgeführt wird.

18. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens in Schritt b) von Anspruch 1 als Salz KCl verwendet wird.

19. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in den Schritten a), c) und d) des Anspruchs 1 auch Gemische verschiedener Alkalisalze und/oder Erdalkalisalze verwendet werden können.

- 5 20. Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäuregemisch ein geklärtes Lysat prokaryontischer Zellen ist.

21. Verwendung des Verfahrens gemäß der Ansprüche 1 bis 20 zur Aufreinigung von Plasmid-DNA.

10

22. Verwendung der mittels eines Verfahrens gemäß der Ansprüche 1 bis 20 gewonnen Plasmide zur Herstellung eines Plasmid-DNA-haltigen Mittels zum Einsatz in der Gentherapie oder genetischen Vakzinierung.

15

1/1

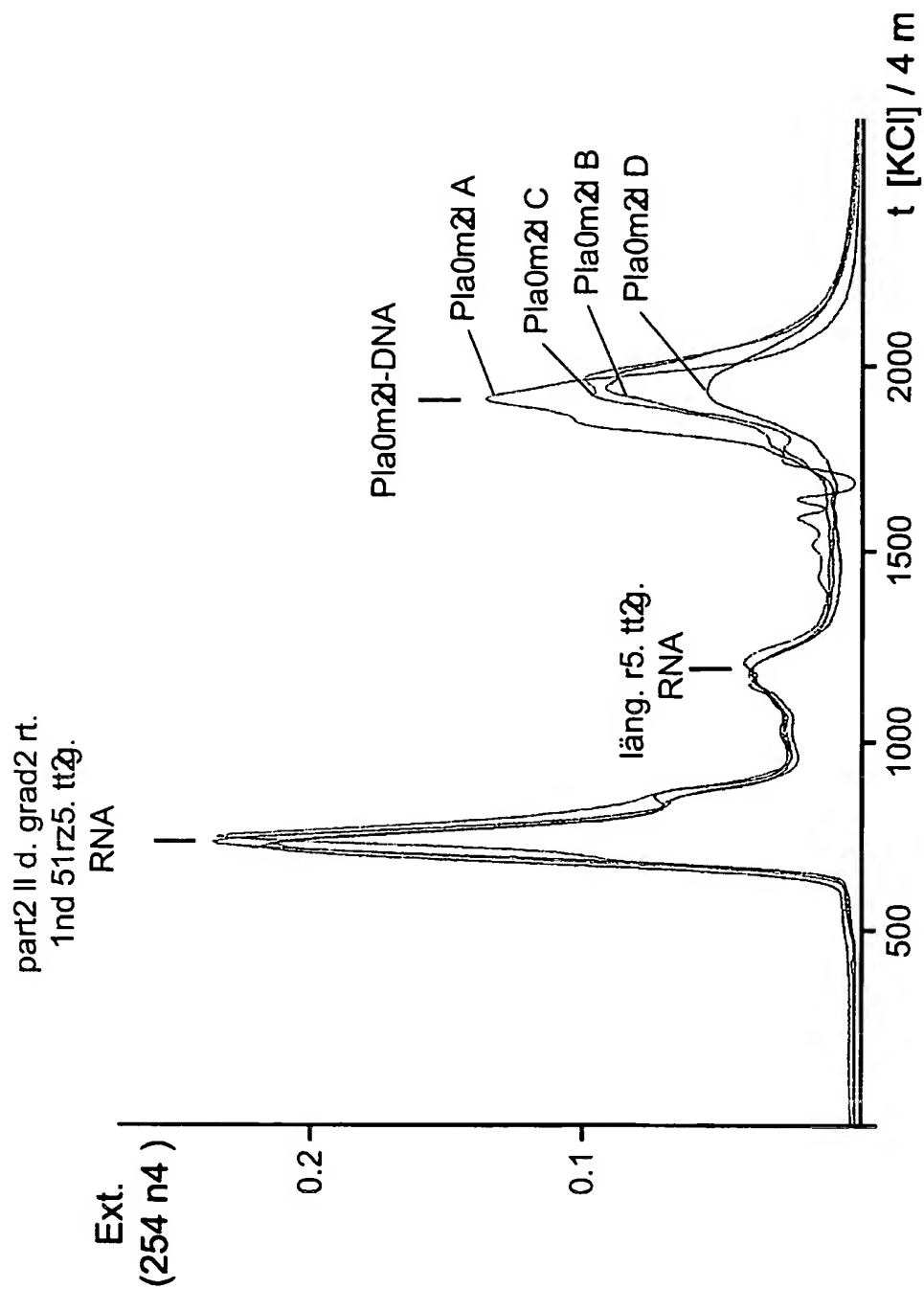


Fig. 1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/000693

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/38516 A (STADLER JOACHIM ; Q ONE BIOTECH LTD (GB); AMERSHAM PHARM BIOTECH AB) 31 May 2001 (2001-05-31)	1-15, 17-22
Y	the whole document	16
Y	US 5 990 301 A (COLPAN METIN ET AL) 23 November 1999 (1999-11-23) column 4, line 60 - column 5, line 4	16
Y	WO 95/21177 A (QIAGEN GMBH ; COLPAN METIN (DE); MORITZ PETER (DE); SCHORR JOACHIM) 10 August 1995 (1995-08-10) page 9, paragraph 3	16
A	US 5 057 426 A (HENCO KARSTEN ET AL) 15 October 1991 (1991-10-15) figure 4	1-22
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 April 2005

Date of mailing of the international search report

29/04/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2260 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Weikl, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/000693

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FERREIRA G N M ET AL: "Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 18, no. 9, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 380-388, XP004214265 ISSN: 0167-7799 page 383, column 2, paragraph 2 - page 385, column 1 -----	1-22
A	PRAZERES D M F ET AL: "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 17, no. 4, April 1999 (1999-04), pages 169-174, XP004162836 ISSN: 0167-7799 the whole document -----	1-22
T	STADLER JOACHIM ET AL: "Plasmid DNA purification." THE JOURNAL OF GENE MEDICINE. ENGLAND FEB 2004, vol. 6 Suppl 1, February 2004 (2004-02), pages S54-S66, XP002272777 ISSN: 1099-498X the whole document -----	1-22
BEST AVAILABLE COPY		
BEST AVAILABLE COPY		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP2005/000693

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0138516	A	31-05-2001	AU 1713601 A WO 0138516 A1	04-06-2001 31-05-2001
US 5990301	A	23-11-1999	AT 181921 T AT 179425 T AT 187733 T AU 684134 B2 AU 1577695 A AU 693511 B2 AU 1577795 A AU 691574 B2 AU 1664695 A CA 2182388 A1 CA 2182397 A1 CA 2182398 A1 DE 59505786 D1 DE 59506355 D1 DE 59507433 D1 DK 743948 T3 DK 775150 T3 DK 743949 T3 WO 9521177 A1 WO 9521178 A1 WO 9521179 A1 EP 0743948 A1 EP 0775150 A1 EP 0743949 A1 JP 9508406 T JP 3379758 B2 JP 9508283 T JP 9508407 T US 6297371 B1 US 2003036175 A1 US 5747663 A US 5792651 A US 2002032324 A1	15-07-1999 15-05-1999 15-01-2000 04-12-1997 21-08-1995 02-07-1998 21-08-1995 21-05-1998 21-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 02-06-1999 12-08-1999 20-01-2000 31-01-2000 08-11-1999 10-04-2000 10-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 27-11-1996 28-05-1997 27-11-1996 26-08-1997 24-02-2003 26-08-1997 26-08-1997 02-10-2001 20-02-2003 05-05-1998 11-08-1998 14-03-2002
WO 9521177	A	10-08-1995	DE 4432654 A1 AT 181921 T AT 179425 T AT 187733 T AU 684134 B2 AU 1577695 A AU 693511 B2 AU 1577795 A AU 691574 B2 AU 1664695 A CA 2182388 A1 CA 2182397 A1 CA 2182398 A1 DE 59505786 D1 DE 59506355 D1 DE 59507433 D1 DK 743948 T3 DK 775150 T3 DK 743949 T3 WO 9521177 A1 WO 9521178 A1	21-03-1996 15-07-1999 15-05-1999 15-01-2000 04-12-1997 21-08-1995 02-07-1998 21-08-1995 21-05-1998 21-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 02-06-1999 12-08-1999 20-01-2000 31-01-2000 08-11-1999 10-04-2000 10-08-1995 10-08-1995

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/000693

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9521177	A	WO 9521179 A1	10-08-1995
		EP 0743948 A1	27-11-1996
		EP 0775150 A1	28-05-1997
		EP 0743949 A1	27-11-1996
		JP 9508406 T	26-08-1997
		JP 3379758 B2	24-02-2003
		JP 9508283 T	26-08-1997
		JP 9508407 T	26-08-1997
		US 6297371 B1	02-10-2001
		US 2003036175 A1	20-02-2003
		US 5747663 A	05-05-1998
		US 5990301 A	23-11-1999
		US 5792651 A	11-08-1998
		US 2002032324 A1	14-03-2002
		AU 1664795 A	29-03-1996
		DE 59510976 D1	13-01-2005
		WO 9608500 A1	21-03-1996
		EP 0781291 A1	02-07-1997
		US 6274371 B1	14-08-2001
<hr/>			
US 5057426	A 15-10-1991	DE 3639949 A1	09-06-1988
		AT 94553 T	15-10-1993
		CA 1339772 C	24-03-1998
		DE 3787445 D1	21-10-1993
		DE 3787445 T2	07-07-1994
		EP 0268946 A2	01-06-1988
		JP 7013077 B	15-02-1995
		JP 63150294 A	22-06-1988
<hr/>			

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/000693

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01/38516 A (STADLER JOACHIM ; Q ONE BIOTECH LTD (GB); AMERSHAM PHARM BIOTECH AB) 31. Mai 2001 (2001-05-31)	1-15, 17-22
Y	das ganze Dokument	16
Y	US 5 990 301 A (COLPAN METIN ET AL) 23. November 1999 (1999-11-23) Spalte 4, Zeile 60 - Spalte 5, Zeile 4	16
Y	WO 95/21177 A (QIAGEN GMBH ; COLPAN METIN (DE); MORITZ PETER (DE); SCHORR JOACHIM) 10. August 1995 (1995-08-10) Seite 9, Absatz 3	16
A	US 5 057 426 A (HENCO KARSTEN ET AL) 15. Oktober 1991 (1991-10-15) Abbildung 4	1-22
	----- -/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. April 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/04/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5918 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Weigl, M



C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>FERREIRA G N M ET AL: "Downstream processing of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccine applications"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 18, Nr. 9, 1. September 2000 (2000-09-01), Seiten 380-388, XP004214265</p> <p>ISSN: 0167-7799</p> <p>Seite 383, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 385, Spalte 1</p> <p>-----</p>	1-22
A	<p>PAZERES D M F ET AL: "Large-scale production of pharmaceutical-grade plasmid DNA for gene therapy: problems and bottlenecks"</p> <p>TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, Bd. 17, Nr. 4, April 1999 (1999-04), Seiten 169-174, XP004162836</p> <p>ISSN: 0167-7799</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-22
T	<p>STADLER JOACHIM ET AL: "Plasmid DNA purification."</p> <p>THE JOURNAL OF GENE MEDICINE. ENGLAND FEB 2004, Bd. 6 Suppl 1, Februar 2004 (2004-02), Seiten S54-S66, XP002272777</p> <p>ISSN: 1099-498X</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-22

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/000693

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0138516 A	31-05-2001	AU 1713601 A WO 0138516 A1	04-06-2001 31-05-2001
US 5990301 A	23-11-1999	AT 181921 T AT 179425 T AT 187733 T AU 684134 B2 AU 1577695 A AU 693511 B2 AU 1577795 A AU 691574 B2 AU 1664695 A CA 2182388 A1 CA 2182397 A1 CA 2182398 A1 DE 59505786 D1 DE 59506355 D1 DE 59507433 D1 DK 743948 T3 DK 775150 T3 DK 743949 T3 WO 9521177 A1 WO 9521178 A1 WO 9521179 A1 EP 0743948 A1 EP 0775150 A1 EP 0743949 A1 JP 9508406 T JP 3379758 B2 JP 9508283 T JP 9508407 T US 6297371 B1 US 2003036175 A1 US 5747663 A US 5792651 A US 2002032324 A1	15-07-1999 15-05-1999 15-01-2000 04-12-1997 21-08-1995 02-07-1998 21-08-1995 21-05-1998 21-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 02-06-1999 12-08-1999 20-01-2000 31-01-2000 08-11-1999 10-04-2000 10-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 27-11-1996 28-05-1997 27-11-1996 26-08-1997 24-02-2003 26-08-1997 26-08-1997 02-10-2001 20-02-2003 05-05-1998 11-08-1998 14-03-2002
WO 9521177 A	10-08-1995	DE 4432654 A1 AT 181921 T AT 179425 T AT 187733 T AU 684134 B2 AU 1577695 A AU 693511 B2 AU 1577795 A AU 691574 B2 AU 1664695 A CA 2182388 A1 CA 2182397 A1 CA 2182398 A1 DE 59505786 D1 DE 59506355 D1 DE 59507433 D1 DK 743948 T3 DK 775150 T3 DK 743949 T3 WO 9521177 A1 WO 9521178 A1	21-03-1996 15-07-1999 15-05-1999 15-01-2000 04-12-1997 21-08-1995 02-07-1998 21-08-1995 21-05-1998 21-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 10-08-1995 02-06-1999 12-08-1999 20-01-2000 31-01-2000 08-11-1999 10-04-2000 10-08-1995 10-08-1995

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/000693

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9521177 A		WO 9521179 A1	10-08-1995
		EP 0743948 A1	27-11-1996
		EP 0775150 A1	28-05-1997
		EP 0743949 A1	27-11-1996
		JP 9508406 T	26-08-1997
		JP 3379758 B2	24-02-2003
		JP 9508283 T	26-08-1997
		JP 9508407 T	26-08-1997
		US 6297371 B1	02-10-2001
		US 2003036175 A1	20-02-2003
		US 5747663 A	05-05-1998
		US 5990301 A	23-11-1999
		US 5792651 A	11-08-1998
		US 2002032324 A1	14-03-2002
		AU 1664795 A	29-03-1996
		DE 59510976 D1	13-01-2005
		WO 9608500 A1	21-03-1996
		EP 0781291 A1	02-07-1997
		US 6274371 B1	14-08-2001
US 5057426 A	15-10-1991	DE 3639949 A1	09-06-1988
		AT 94553 T	15-10-1993
		CA 1339772 C	24-03-1998
		DE 3787445 D1	21-10-1993
		DE 3787445 T2	07-07-1994
		EP 0268946 A2	01-06-1988
		JP 7013077 B	15-02-1995
		JP 63150294 A	22-06-1988